

Genetikai markerek alkalmazása a szelídgesztenye kéregrák (*Cryphonectria parasitica*) populációinak jellemzésére

Göröcsös Gábor – Tarcali Gábor – Irinyi László – Radócz László

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Mezőgazdaságtudományi Kar Növényvédelmi Intézet Debrecen
gorcosgabi@hotmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A szelídgesztenye (*Castanea sativa*) egyik legjelentősebb betegsége a szelídgesztenye kéregrák. A súlyos és rendszerint teljes pusztulással végződő betegség előidézője a *Cryphonectria parasitica* aszkomikóta gomba. A betegség nem kizárólag a szelídgesztenyét támadja meg, észlelték már többek között a kocsányos tölgyön is, de itt a betegség lefolyása illetve a tünetei eltérnek a szelídgesztenyén megfigyeltétől. A megbetegedett fákon megfigyelhető a kéreg rákos elhalása, valamint az ebből fakadó hervadás. A konídiumok szétszóródása elősegíti a betegség villámgyors terjedését, valamint a környező fákra történő átvitelt is. Magyarországon először 1969-ben figyelték meg a betegséget, mára már minden jelentős szelídgesztenye termőterületen jelen van. Kutatásaink során célul tűztük ki, hogy megtaláljuk a leginkább alkalmas genetikai markert amellyel jól elkülöníthetjük a különböző *Cryphonectria parasitica* populációkat. Munkánk során két a molekuláris biológiai kutatásokban általánosan elterjedt markert alkalmaztunk. Vizsgálatunk során 20 különböző populáció 70 izolátumát használtunk fel. A *tefl* fehérje a sejten belül a citoszólban található. Eukaryota-knál a fehérjeszintézis folyamatában elsődleges funkciója, hogy a megfelelő tRNS a megfelelő mRNS-el kapcsolódjon össze, és ellenőrizi az átírási sebességét és hűségét. Az ITS (Internal Transcribed Spacer) régiók evolúciós mércével mérve viszonylag gyorsan változnak, ezért többségében alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok vizsgálatánál, például közeli rokon fajok vagy populációk egymástól való elkülönítésénél használják fonalas gombáknál. A vizsgálatok során kapott eredményekből törzsfákat készítettünk melyek jól szemléltetik a különböző populációkból származó izolátumok egymáshoz viszonyított helyzetét. Ebből megállapítható a különböző markerek használhatósága a populációk szétválasztására.

SUMMARY

Chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) is one of the most important disease of the European chestnut (*Castanea sativa*). This Ascomycete fungal pathogen caused by serious and usually deathly damages in chestnut orchards and in forests. It is important to mention that the pathogen does not only infect the sweet chestnut but oak also species (*Quercus* spp.). The susceptibility of oak species to the pathogen can be lower than the sweet chestnut. Destroyed bark of cankers, and the serious wilting can be observed on infected trees. The dispersal conidia promotes fast spread of the disease, and further dissemination to the surrounding trees. In the Carpathian-Basin, the chestnut is endemic in the Mecsek mountains, in Zala, in Somogy counties but it also can be found in the Danube-bend area. The first detection about the chestnut blight in Hungary was done in 1969, but today's the disease is generally spread in the whole country. The aim of our study was to found the perfect genetic marker, which can help to separate the different origins of *Cryphonectria parasitica* populations clearly. Two current molecular biology markers were used in our study. We have analyzed 70 *Cryphonectria parasitica* strains isolated from 20 different plots of European chestnut orchards, but mainly from the Carpathian-basin. In this study we employed a part of the translation elongation factor 1 subunit alpha (*EF-1 α* =*tefl*) containing both introns and exons and ITS region containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2 and the 5.8S rDNA. Translation elongation factor 1 subunit alpha (*EF-1 α* =*tefl*) is part of the cytosolic *EF1* complex, whose primary function is to promote the binding of aminoacyl-tRNA to the ribosome in a GTP-dependent process. After the analysis we have created a phylogenetic tree based on ITS and *tefl* sequences. This phylogenetic tree shows the genetic differences between the populations.

Kulcsszavak: *Cryphonectria parasitica*, ITS régió, *tefl*, szelídgesztenye, genetikai marker

Keywords: *Cryphonectria parasitica*, ITS region, *tefl*, sweet chestnut, genetic marker

BEVEZETÉS

A Bükkfafélék (*Fagaceae*) családjába tartozó európai szelídgesztenye (*Castanea sativa*) nagyon kedvelt dísz- és héjas gyümölcsfánk, mely elsősorban a savanyú, jó vízellátottságú, káliumban gazdag talajokat kedveli (Soó, 1962). Hazánkban Dél-Dunántúlon a Mecsekben, az Északi-középhegységben, Alpokalján, a Dunakanyarban és a Zalai dombság területén fordul elő (Radócz, 2002; Körtvély, 1969). A *Cryphonectria parasitica*, mely a szelídgesztenye egyik legfontosabb kórokozója, a gesztenyén kívül a Bükkfafélék családjába tartozó egyéb fajokat is veszélyeztet, így pl. a tölgyeket és a bükköt is (Anagnostakis, 1987). A gomba Kelet Ázsiából, valószínűleg Japánból, lett behurcolva a XIX. sz. végén és a XX. század elején az Egyesült Államokon keresztül Európába (Braghi, 1946). Vizsgálatunk során Magyarországról származó *Cryphonectria parasitica* izolátumok diverzitását vizsgáltuk molekuláris markerrel. A „translation elongation factor 1 subunit alpha” (*EF-1 α*) fehérje a sejten belül a citoszólban található (Moldave, 1985). A fehérjét kódoló *tefl* gén minden élő szervezetben megtalálható, és az más szekvenciákkal szemben nagy előnye, hogy a gén csak egy kópiában van jelen a genomban (Baldauf és Doolittle, 1997). A fajok közötti és fajon belüli rendszertani kapcsolatok felderítésére egyaránt alkalmas, mint azt Roger *et al.* (1999) különböző fajoknál (pl. *Mucor racemosus*, *Podospora anserina*),

illetve Druzhinina és Kubicek (2005) *Trichoderma* fajoknál bizonyították. Filogenetikai vizsgálatunkhoz a *tefl* gén nagy intronját tartalmazó fragmentumát választottuk. A filogenetikai vizsgálatokhoz már hosszú ideje a legszélesebb körben használt konzervatív régiók a sejtmagban és a mitokondriumban található riboszomális rRNS szekvenciákat kódoló gének (rDNS) (Moncalvo *et al.*, 2002; Avise, 2004). Ezek közül is különösen azok, amelyek gyakorlatilag azonos szekvenciájú, tandem másolatként vannak jelen a genomban. Minden egyes másolat rendelkezik kódoló és nem-kódoló régiókkal. A kódoló régiókhoz tartoznak a 18S-t (vagy kis alegységet, Small Subunit, SSU), az 5,8S-t, valamint a 28S-t (nagy alegységet, Large Subunit, LSU), továbbá az 5S riboszóma alegységet kódoló gének (Gerbi, 1985). Ezek sokkal kevésbé variábilisak, mint a nem-kódoló szakaszok, melyek lehetnek átírtak, mint az ITS (Internal Transcribed Spacer) régiók vagy nem átíródó régiók, mint az IGS (Intergenic Spacer) (Gunderson *et al.*, 1987; Lane *et al.*, 1985).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatunk során 50 Kárpát-medencéből és 20 Európa más részeiről (Görögország, Bulgária, Portugália, Macedónia) származó *Cryphonectria parasitica* izolátumnak a *tefl* és ITS régióját vizsgáltuk. A vizsgálatok során a magyarországi izolátumok mellett génbanki adatbázisban megtalálható (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) *Cryphonectria parasitica* izolátumok *tefl* és ITS régióját is bevontuk az elemzésbe. Az izolátumokat 50 ml malátakivonat-táptalamban tenyésztettük 48 órán keresztül, 100 ml-es Erlenneyer lombikokban, sötétben, rázatva (125 rpm). A sejteket dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben fagyasztva tártuk fel, majd genomi DNS-t izoláltunk. A DNS-izolálását a NucleoSpin II (Macherey-Nagel, 740770) alkalmazásával végeztük a gyári protokollt követve. Az ITS-fragmentum felszaporításához a következő primerpárt használtuk: SR6R: 5'-AAG TAG AAG TCG TAA CAA GG-3' (SSU) 23 bp; az LR1: 5'-GGT TGG TTT CTT TTC CT-3' (LSU) 17 bp (White *et al.*, 1990). A felszaporított és tisztított PCR-termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany cég végezte térítéses megbízással. Az általuk alkalmazott szekvenálás a Sanger-féle módszeren alapszik (Sanger *et al.*, 1977), és az ABI cég által fejlesztett gépekkel végzik. A Parsimony típusú filogenetikai elemzést a Paup*4.0b programmal végeztük. A keresés során „branch swapping” típusú heurisztikus, Tree Bisection and Reconnection (TBR) stratégiájú újrendezést alkalmaztunk. A TBR az jelenti, hogy a törzsfát két részre bontják, amelyeket majd ismét párosítanak egy újabb elágazáson keresztül. A folyamat az összes lehetséges elágazást számításba veszi, majd kiválasztja közülük a legvalószínűbbet. Az elemzés során minden egyes karaktert azonos súllyal vettünk figyelembe, az összerendezésben szereplő kihagyásokat (gap-eket) pedig hiányzó adatként kezeltünk. A törzsfá stabilitását bootstrap analízissel ellenőriztük 1000 ismétlést alkalmazva. A törzsfák megrajzolásához a TreeView (Page, 1996) programot használtuk. A különböző elemzéseket egy Intel Pentium 4 CPU 2,4 GHz teljesítményű és 1 GB RAM memóriájú számítógépen végeztük. A szekvenciákat a ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol szükséges volt. Az evolúciós modellek kiválasztásához a Modeltest programot használtuk (Posada és Grandall, 1998). Ezt követően a filogenetikai analíziseket a Paup*4.0b (Swofford, 2002), illetve a MrBayes (Huelsenbeck és Ronquist 2001) program alkalmazásával végeztük el.

EREDMÉNYEK

1. ábra: A PCR során felszaporított ITS-szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)



Figure 1: Agarose gel stained with ethidium bromide showing amplified ITS fragments

A DNS-izolálását a NucleoSpin II (Macherey-Nagel, 740770) alkalmazásával végeztük a gyári protokollt követve, melynek eredményeként átlagban 100 ng/μl koncentrációjú DNS-oldat keletkezett. A genomi DNS izolációját követően a PCR során a primerpárokkal, egy 600 bp hosszúságú ITS-fragmentum szaporodott fel mindegyik izolátum esetében (1. ábra).

A *tefl* szekvenciák esetében a DNS izolációját követően a PCR során a primerpárokkal, egy 350 bp hosszúságú *tefl* fragmentum szaporodott fel mindegyik izolátum esetében (2. ábra). A szekvenciákat a ClustalX program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol az a nyilvánvaló hibák miatt szükséges volt.

2. ábra: A PCR során felszaporított *tefl* szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)

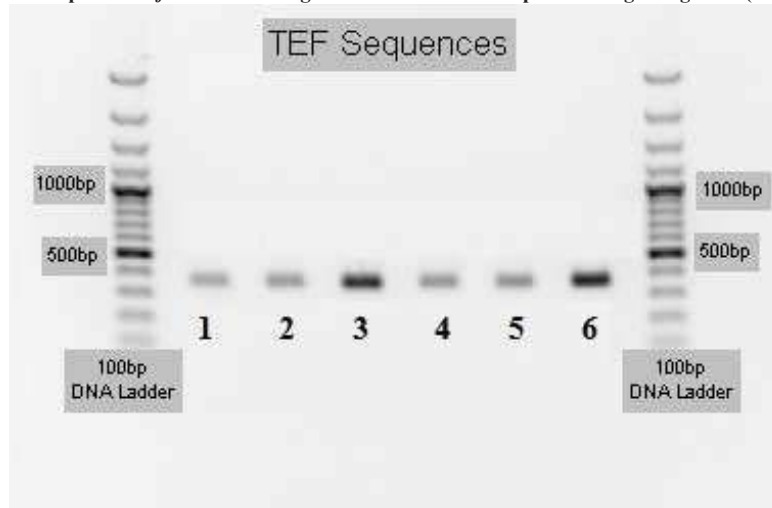


Figure 2: Agarose gel stained with ethidium bromide showing amplified *tefl* fragments

A Parsimony elemzés során kapott filogenetikai törzsfák a 3 és 4. ábrán láthatóak. Az elemzés során a program 547 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 539 karaktert konstansnak, 6 karaktert nem-informatívnak tekintett, és csak 2 karaktert becsült informatívnak. A bootstrap analízis során kapott magas bootstrap értékek megerősítették az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel alátámasztva a felrajzolt filogenetikai törzsfák helyességét. Az egyes izolátumok közötti távolságok (bázisok közötti különbség, elágazások hossza) nem bizonyultak kellően eltérőnek ahhoz, hogy az eredmények alapján a filogenetikai törzsfát jól megalapozottnak tekinthessük.

3. ábra: Filogenetikai kapcsolatok alakulása atef1 szekvenciák Parsimony analízissal történő vizsgálata alapján



Figure 3: Phylogenetic relationships of *Cryphonectria parasitica* strains inferred by Parsimony analysis of *tef1* sequences.

The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values. Our isolates are indicated by colors, the isolates downloaded from GenBank indicated by black color.

4. ábra: Filogenetikai kapcsolatok alakulása az ITS szekvenciák Parsimony analízissal történő vizsgálata alapján

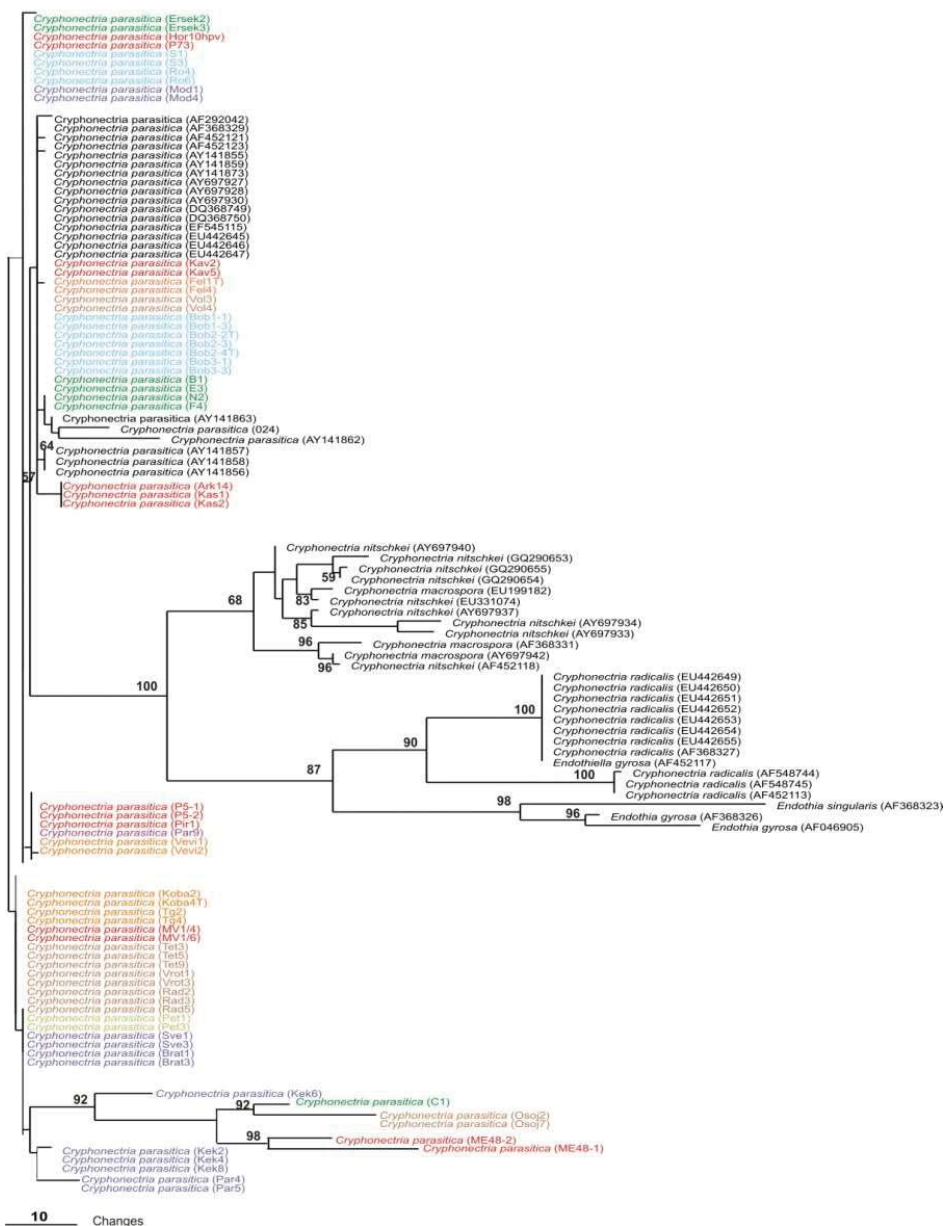


Figure 4. Phylogenetic relationships of *Cryphonectria parasitica* strains inferred by Parsimony analysis of ITS sequences. The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values. Our isolates are indicated by colors, the isolates downloaded from GenBank indicated by black color.

KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az *tef* régió más gomba fajokkal ellentétben nem alkalmas populációgenetikai vizsgálatokra a *Cryphonectria parasitica* fajnál mivel a *tef* szekvenciák azonosságát mutatnak a különböző helyről származó izolátumoknál. Az ITS régió vizsgálata már mutatott különbséget az egyes izolátumok között azonban a Parsimony elemzés során az informatív karakterek alacsony száma megerősíti, hogy az ITS régió is csak korlátozottan alkalmas a diverzitás vizsgálatára a *Cryphonectria parasitica* fajnál. a görög, a portugál, a macedón, a Kárpát-medencéből származó, illetve az adatbázisból letöltött izolátumok külön csoportot alkotnak, hogy az ITS szekvencia csak nagy földrajzi távolságban lévő izolátumok vizsgálatára alkalmas. Magyarországi populációk vizsgálatára egyéb molekuláris markerek alkalmazása szükséges. Ilyen marker lehet a mikroszatellit, melynek alkalmazására már végeztek kísérleteket többek között Franciaországban (Breuillin *et al.*, 2006).

IRODALOM

- Anagnostakis SL, (1987). Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79: 23–37.
- Awise, J.C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Baldauf, S.L., Doolittle, W.F. (1997). Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12007-12012.
- Braghi, A. (1946). Il cranco del castagno causato da *Endothia parasitica* Ital. Agric. 7: 406-412.
- Breuillin F. Dutech C. Robin C. (2006). Genetic Diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycological research* 110, 288-296.
- Druzhinina, I., Kubicek, C.P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster? *Journal of Zhejiang University Science* 6B: 100-112.
- Gerbi, S.A. (1985). Evolution of ribosomal DNA. pp. 419-517. In: *Molecular evolutionary genetics*. Macintyre, R. J. (Ed.) Plenum, New York.
- Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K., Sogin, M.L. (1987). Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 5823-5827.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Körtvély, A. (1969). A gesztenye edotías kéregelhalása. *Növényvédelem* 6: 358-361.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 82: 6955-6959.
- Moldave, K. (1985). Eukaryotic protein synthesis. *Annual review of biochemistry* 54: 1109-1149.
- Moncalvo, J.M., Lutzoni, F.M., Rehner, S.A., Johnson J., Vilgalys, R. (2002). Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 49: 278-305.
- Nicholas, K.B., Nicholas, Jr. H.B., Deerfield, II D.W.I. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew news* 4: 14.
- Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Posada, D., Grandall K.A. (1998). Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Radócz L. (2002): A héjasok növényvédelme. Szaktudás Kiadó Ház. Budapest, 256 p.
- Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H. (1999). An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryots. *Molecular biology and evolution* 16: 218-233.
- Sanger F., Micklen S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467.
- Soó R. (1962): Növényföldrajz. Tankönyvkiadó. Budapest. 157 p.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) Academic Press, Inc., New York.